

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表平10-511085

(43)公表日 平成10年(1998)10月27日

(51)Int.Cl.<sup>6</sup>  
A 61 K 39/395

識別記号  
ABD

F I  
A 61 K 39/395

ABDQ  
R  
S  
T

C 12 N 15/02

C 12 P 21/08

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 39 頁) 最終頁に統く

(21)出願番号 特願平8-519017  
(86) (22)出願日 平成7年(1995)11月28日  
(85)翻訳文提出日 平成9年(1997)6月2日  
(86)国際出願番号 PCT/US95/15476  
(87)国際公開番号 WO96/16673  
(87)国際公開日 平成8年(1996)6月6日  
(31)優先権主張番号 08/349,489  
(32)優先日 1994年12月2日  
(33)優先権主張国 米国(US)  
(31)優先権主張番号 08/485,786  
(32)優先日 1995年6月7日  
(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 カイロン コーポレイション  
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94608,  
エミリービル, ホートン ストリート  
4560  
(72)発明者 リン, デイビッド ピー  
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94301,  
バロ アルト, クーパー ストリート  
2375  
(74)代理人 弁理士 山本 秀策

最終頁に統く

(54)【発明の名称】二重特異性抗体を用いる免疫応答を促進する方法

(57)【要約】

本発明は、患者に免疫応答を誘導する方法を提供する。  
本方法は、Fc<sub>γ</sub>RIIIおよび第2の抗原を認識および結合し得る二重特異性分子を投与する工程を包含する。第2の抗原は、ガン抗原、ウイルス抗原、真菌抗原、寄生虫の抗原、または毒素であり得る。第2の抗原は、本発明の方法が実施されるときにおいて、患者中に存在し得るか、または存在しなくてもよい。

**【特許請求の範囲】**

1. 患者の免疫応答を誘導する方法であって、二重特異性抗体を患者に投与する工程を包含し、該二重特異性抗体が、Fc<sub>γ</sub> RIIIである第1の抗原を認識および結合し得る第1の結合部位を含み、そしてさらに、第2の抗原を認識および結合し得る第2の結合部位を含む抗体である、方法。
2. 前記第1の結合部位が、3G8ハイブリドーマより產生されるモノクローナル抗体由来の結合部位である、請求項1に記載の方法。
3. 前記第2の抗原が患者内に存在する、請求項1に記載の方法。
4. 前記第2の抗原が自己抗原である、請求項1に記載の方法。
5. 前記第2の抗原がガン抗原である、請求項1に記載の方法。
6. 前記ガン抗原が、145kD腫瘍タンパク質、42kD腫瘍糖タンパク質、および腫瘍関連糖脂質からなる群より選択される、請求項5に記載の方法。  
c-erbB-2、145kD、175kD、40kD、60kD、100kD、42kD、55kD、66kD、75kD、80kD、腫瘍関連糖脂質、HMWムチン、HMWムチンII、およびp-糖タンパク質。
7. 前記第2の結合部位が、以下からなる群より選択されるハイブリドーマにより產生されるモノクローナル抗体由来の結合部位を含む、請求項6に記載の方法  
：  
42H8(HB11830)、452F2(HB10811)、741F8(HB10807)、520C9(HB8696)、759E3(HB10808)、454C11(HB8484)、387H9(HB10802)、113F1(HB8490)、317G5(HB8485、HB8691)、34F2(HB11052)、650E2(HB10812)、35E6(HB11769)、266B2(HB8486)、106A10(HB10789)、260F9(HB8488およびHB8662)、33F8(HB8697)、9C6(IHB10785)、35E10(HB10796)、140A7(HB10798)、36H3(HB11768)、788G6(HB8692)、200F9(HB10791)、697B3(HB10806)、120H7(HB10790)、203E2(HB10799)、254H9(HB10792)、245E7(HB8489)、2G3(HB8491)、369F10(HB8682)、15D3(HB11342)、421E8(HB10793)、310B7(HB11752)、32A1(HB10795)、219F3(10801)、42E7(HB11751)、および388D4(HB10794)。
8. 前記二重特異性抗体が、CRL10197およびHB10501からなる群より選択される

ハイブリドーマにより產生される、請求項1に記載の方法。

9. 前記ガン抗原が、以下からなる群より選択される、請求項5に記載の方法：

- a) 扁平上皮細胞腫瘍抗原；
- b) 300,000ダルトンの糖タンパク質乳ガン抗原；および
- c) ガンに関連する、195kD腫瘍関連抗原；
- d) 腫瘍関連ガングリオシド。

10. 前記腫瘍関連ガングリオシドが、CD3、CD2、GM3、GM1、G2、6C、Le<sup>x</sup>、またはLe<sup>a</sup>である、請求項9に記載の方法。

11. 前記第2の抗原が、ウイルス抗原である、請求項1に記載の方法。

12. 前記ウイルス抗原がウイルスにより発現され、該ウイルスが、HIV、HAV、HBV、HCV、HPV、HSV、CMV、EBV、およびインフルエンザウイルスからなる群より選択される、請求項11に記載の方法。

13. 前記ウイルス抗原が、HIV抗原である、請求項12に記載の方法。

14. 前記HIV抗原が、HIV糖タンパク質である、請求項13に記載の方法。

15. 前記HIV抗原が、HIV糖タンパク質gp120である、請求項14に記載の方法。

。

16. 前記HIV抗原が、HIV糖タンパク質gp120のV3-PND領域である、請求項15に記載の方法。

17. 前記ウイルス抗原が、HAV抗原である、請求項11に記載の方法。

18. 前記HAV抗原が、抗HAVモノクローナル抗体K3-4C8およびB5-B3に結合する、請求項17に記載の方法。

19. 前記ウイルス抗原が、HBV抗原である、請求項11に記載の方法。

20. 前記HBV抗原が、HBVタンパク質のpre-S1領域、pre-S2領域、またはS領域をコードするドメインである、請求項19に記載の方法。

21. 前記ウイルス抗原が、HCV抗原である、請求項11に記載の方法。

22. 前記HCV抗原が、E1またはE2のいずれかである、請求項21に記載の方法。

。

23. 前記ウイルス抗原が、HPV抗原である、請求項11に記載の方法。

24. 前記HPV抗原が、HPVII型抗原である、請求項23に記載の方法。
25. 前記ウイルス抗原が、HSV抗原である、請求項11に記載の方法。
26. 前記HSV抗原が、HSVエンベロープ糖タンパク質である、請求項25に記載の方法。
27. 前記HSVエンベロープ糖タンパク質が、クローンA19080023A、A19090023A  
、  
A19100023A、A19170023A、またはA19180023Aとして同定された抗体に結合する、  
請求項26に記載の方法。
28. 前記ウイルス抗原が、CMV抗原である、請求項11に記載の方法。
29. 前記CMV抗原が、CMVまたは主要CMVエンベロープ糖タンパク質であるgB (g  
pUL55)に対する、即時初期非構造的抗原、および即時初期抗原、初期抗原、後  
期抗原である、請求項28に記載の方法。
30. 前記CMV抗原が、CMV抗原クローンA28020069PまたはA28030069Pに対するモ  
ノクローナル抗体に結合する、請求項29に記載の方法。
31. 前記ウイルス抗原が、EBV抗原である、請求項11に記載の方法。
32. 前記EBV抗原が、潜在膜タンパク質 (LMP) またはエプスタイン・バールウ  
イルス核抗原-2のいずれかである、請求項31に記載の方法。
33. 前記ウイルス抗原が、インフルエンザウイルス抗原である、請求項32に  
記載の方法。
34. 前記インフルエンザウイルス抗原が、インフルエンザウイルスAまたはイ  
ンフルエンザウイルスBに対する抗原である、請求項33に記載の方法。
35. 前記インフルエンザウイルスが、インフルエンザA感染ウイルスクローン  
A60010044Pに対するモノクローナル抗体に結合する、または前記インフルエンザ  
ウイルスBが、インフルエンザB感染ウイルスクローンA60020044Aに対するモノ  
クローナル抗体に結合する、請求項34に記載の方法。
36. 前記第2の抗原が、真菌抗原である、請求項1に記載の方法。
37. 前記真菌抗原が、C. neoformansのポリ多糖である、請求項36に記載の

方法。

38. 前記第2の抗原が、寄生虫の抗原である、請求項1に記載の方法。
39. 前記寄生虫の抗原が、マラリア抗原である、請求項38に記載の方法。
40. 前記マラリア抗原が、ペプチドPfEMP3である、請求項39に記載の方法。
41. 前記第2の抗原が、毒素である、請求項1に記載の方法。
42. 前記毒素が、破傷風毒素である、請求項41に記載の方法。
43. 前記抗原が、破傷風毒素の重C鎖フラグメントである、請求項42に記載の方法。
44. 前記第2の抗原が、二重特異性抗体を一次投与した患者には存在しない、請求項1に記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

### 二重特異性抗体を用いる免疫応答を促進する方法

#### 発明の背景

本発明は、抗体の1つのアーム (arm) がFc<sub>γ</sub> RIIIを認識および結合する、CD16と呼ばれる二重特異性抗体を用いる、患者の免疫応答を誘導または促進する方法に関する。本発明の方法において有用な二重特異性抗体は、例えば、c-erbB-2抗原を認識および結合する二重特異性抗体2B1のような、Fc<sub>γ</sub> RIIIおよびガン抗原に対する二重特異性抗体を包含する。さらに、本発明はまた、Fc<sub>γ</sub> RIIIおよびウイルス抗原または別の抗原に対する二重特異性抗体を用いる、患者の免疫応答の誘導に関する。

免疫応答を誘導するための二重特異性抗体の使用は、それらのポリペプチド構成部分である、重鎖および軽鎖の構造に由来する抗体の生物学的特性の原理を利用する。重鎖は、軽鎖の約2倍の大きさで、そしてそれぞれの抗体の化学量論は、H<sub>2</sub>-L<sub>2</sub>である。重鎖および軽鎖は、非共有的な力および共有的な鎖間ジスルフィド架橋により結合している。重鎖は、4つの折り畳まれた球状ドメインからなり、そして軽鎖は、2つの折り畳まれた球状ドメインからなる。各球状ドメインは、約100から110アミノ酸を含有する。重鎖において可変領域V<sub>H</sub>はアミノ末端部分を形成し、定常領域C<sub>H1</sub>、C<sub>H2</sub>、およびC<sub>H3</sub>は、残りの部分を形成する。軽鎖は、可変領域V<sub>L</sub>、および定常領域C<sub>L1</sub>からなる。対応するV<sub>L</sub>、領域と並列するV<sub>H</sub>領域は、抗体分子の、抗原結合領域または抗原認識部位を形成する。

抗体産生細胞の分化の間に生じた抗体分子の可変領域の極度の配列多様性は、生物にタンパク質、単純および複合炭水化物、単純中間体代謝産物、糖、脂質、ホルモン、リン脂質、および核酸を包含する広範な抗原を認識し得る抗体を產生させ得る。重鎖および軽鎖の可変領域はそれぞれ、超可変領域と呼ばれる極度に可変な3つの短い領域、または5～12アミノ酸の相補性決定領域 (CDR) により分けられる、15～30アミノ酸のフレームワーク領域 (FR) と呼ばれる4つの比較的不变の領域からなる。これらのCDRの配列は、抗原特異性を最初に決定する。

各鎖内のCDRは、Parslowら、Basic and Clinical Immunology、(第8版, Apple

ton & Lange, 1994) 第6章に記載のように、N-末端からCDR1, CDR2、およびCDR3と称される。

抗体は、2つの結合部位を有し、通常、これらは両方同じエピトープを認識する。しかし、2つの異なるエピトープに対する結合特異性を有する二重特異性抗体の重要性が、最近明らかになった。二重特異性抗体は、2つの異なる抗体の化学的な結合により形成され得る。あるいは、二重特異性抗体は、例えば、Ringら、Breast Epithelial Antigen: Molecular Biology to Clinical Applications, Ceriani編 (Plenum Press, NY, 1991) 91~104頁および米国特許第4,714,681号（これらの開示は参考として本明細書中で援用される）に示されるように、2つのモノクローナル抗体産生細胞の細胞融合物である、ハイブリッドハイブリドーマから単離され得る。

2つのイソ型AおよびBを有する、Fc<sub>γ</sub> RI, Fc<sub>γ</sub> RII, およびFc<sub>γ</sub> RIIIを包含する少なくとも3つのFcレセプターが存在する。Fc<sub>γ</sub> RIIIAイソ型 (CD16とも呼ばれる) はまた、IgGのFc部分に $2 \times 10^{-6}$ Mの親和性で結合し得る50~70kDの細胞表面分子であり、そしてナチュラルキラー (NK) 細胞、好中球、好酸球、 $\gamma/\delta$ リンパ球、マクロファージ、およびいくつかの単球上に見出される。Perussiaら、J. of Immunology, (1991)132:1410~1415。この考察によれば、Fc<sub>γ</sub> RIIIは、Fc<sub>γ</sub> RIIIAイソ型のみを含むと理解されるべきである。Fc<sub>γ</sub> RIIIは、低親和性レセプターであり、そして单量体IgGよりも凝集IgGに効果的に結合する。NK細胞は、そのFc<sub>γ</sub> RIII分子表面結合分子を、抗体のFc部分に結合するために、抗原と結合した自身に、例えば、標的細胞の表面上で結合するために使用する。NK細胞上でのFc<sub>γ</sub> RIII分子に対する抗体のFc部分の結合は、NK細胞を活性化して標的細胞を溶解させる。NK細胞はまた、CD3 $\zeta$ 鎖のホモダイマーまたは $\gamma$ と呼ばれるホモダイマー化タンパク質を発現する。両方のホモダイマーは、Fc<sub>γ</sub> RIIIへのIgG結合により開始されるシグナル伝達に関与すると考えられる。

インビトロ系における抗原提示細胞上のFcレセプターに対する抗原を標的とする二重特異性抗体を使用することが、Sniderら、J. Immunol.(1987)139:1609~1616で最初に記載された。この研究は、抗原提示細胞の表面の標的構造に対する抗

体に共有的に架橋したタンパク質抗原に対する抗体を含有する、抗体ヘテロ凝集体を用いた。抗原提示は、抗原特異的T細胞ハイブリドーマにより放出されたりンホカインの測定によって評価された。増大した提示が、抗原がマウスB細胞リンパ腫／ハイブリドーマ表面上でMHCクラスIおよびクラスII分子、表面免疫グロブリン、またはFc<sub>γ</sub>レセプターに標的とされた場合に起こった。架橋抗体それぞれの提示を増大する能力は、抗原提示細胞の表面に結合するそれぞれの全量に匹敵する。この研究はまた、架橋抗体を用いた1つの抗原の提示が、第2のバイスランダー抗原の提示の増大をもたらさないを見い出した。

Fc<sub>γ</sub> RIIIおよびCA19-9ガン抗原に対して親和性を有する二重特異性抗体の抗腫瘍効果が、マウスで、Palazzoら、Cancer Research(1992)52:5713~5719の記載のように示された。この報告で、二重特異性抗体CL158が、IL-2活性化全血の存在下で単層で増殖する腺ガン様細胞(SW948腫瘍細胞)の溶解を媒介することを最初に示した。腫瘍細胞の溶解を、4時間後に起こった<sup>11</sup>放出によりモニターした。次に、SW948細胞がインビトロで多細胞ヒト腫瘍スフェロイドとして増殖された場合に、インターロイキン-2活性化リンパ球(LAK細胞)ならびにFc<sub>γ</sub> RIIIおよびCA19-9ガン抗原を認識するCL158を用いたインキュベーションが、腫瘍細胞の広範な構造的溶解を引き起こすことを示した。スフェロイド中の腫瘍の溶解が、24時間後に起こった。

Palazzoらはまた、二重特異性抗体の潜在的なインビオでの効力をテストするために用いられた皮下腫瘍を有する重症複合免疫不全症マウス異種移植動物モデルを記載した。これらは、腫瘍およびFc<sub>γ</sub> RIIIを標的とする二重特異性マウスマノクローナル抗体および腫瘍抗原が、大型顆粒リンパ球により、マウスの関連する腫瘍溶解を促進し得ることを示した。この研究では、十分な溶解が、LAK細胞、IL-2、および二重特異性抗体CL158を用いたマウスの処置によって起こった。放射活性放出を測定する細胞障害性アッセイは、腫瘍溶解能力について行われるが、固形の腫瘍の破壊を浸透および媒介する、細胞傷害性エフェクター細胞能力について行われないことが容認された。この実験で示された本研究の限られた成功は、腫瘍細胞とのLAK細胞の密接な物理的な結合に依存する。

細胞エフェクターメカニズムによる溶解について腫瘍を標的とするモノクロー

ナル抗体の能力の利用が、マウスにおいて、Weinerら、Cancer Res.(1993)53:94～100に記載のように示された。Hsieh-Maら、Cancer Res.(1992)52:6832～39もまた参考のこと。この研究においては、c-erbB-2腫瘍遺伝子産物の細胞外ドメインおよびヒトFc<sub>γ</sub>レセプターであるFc<sub>γ</sub>RIIIに対して特異性を有する二重特異性モノクローナル抗体2B1の効果を試験した。IL-2活性化LAK細胞またはPBL細胞との2B1の投与は、マウス発現c-erbB-2抗原の中程度の残存性を増大する。これらの効果は、二重特異性抗体およびヒトエフェクター細胞が、Fc-ドメイン媒介効果を阻害するヒト血清中に投与された場合に保存されたが、2B1の親抗c-erbB-2抗体である520C9の抗腫瘍特性は、血清またはE(ab')2フラグメントの投与により完全に排除された。この研究の成功は、IL-2活性化細胞の同時投与に依存して維持され、そして、マウスに移植されたヒト腫瘍が、適切なヒトエフェクター細胞を同時投与されることを提供した2B1に基づく治療により十分に標的化され得ることを示唆した。

Sinderら、J. Exp. Med.(1990)171:1957～63は、マウスの抗原提示細胞(APC)上のFcレセプターに対する抗原を標的とする二重特異性抗体が、マウスの抗原の免疫原性を増大することを最初に報告した。二重特異性抗体は、ニワトリ卵リゾチーム(HEL)に特異性を有する抗体と、いずれも特定のAPC細胞表面成分に特異的な、Fc<sub>γ</sub>RIIならびに抗-I-Aおよび抗-IgDに対する抗体を含む種々の別の抗体と、化学的に架橋させることにより調製した。この研究は、異種架橋二重特異的抗体が、アジュバントの非存在下でナノグラム量の抗原を一旦投与された場合に、マウスに高い力値の抗体を誘導し、そして、可溶性の抗原を用いて再投与した場合、一次免疫したマウスが二次IgG抗体に対して応答することを示した。

従ってさらに、二重特異性抗体の効力の研究において、局部的な腫瘍細胞の溶解が細胞およびマウスのインビボの研究において観察された。この研究では、エフェクター細胞は二重特異性抗体の投与により腫瘍細胞に非常に近接していた。

ヒトにおける二重特異性抗体の投与の効力を決定すること、およびガン、ウイルス感染、または免疫系を回避することが知られる別の疾患を有するヒトにおける有益な免疫応答を促進する方法を開発することは、明らかに有用である。

発明の要旨

本発明は、患者に二重特異性抗体を投与する工程を有する、患者における免疫応答の誘導方法に関する。前記二重特異性抗体は、第1の抗原を認識および結合し得る第1の結合部位を有し、この第1の抗原はFc<sub>γ</sub> RIIIである。そして前記二重特異性抗体はまた、第2の抗原を認識および結合し得る第2の結合部位を有する。第1の結合部位は、3G8ハイブリドーマより産生されるモノクローナル抗体由来の結合部位であり得る。

二重特異性抗体により認識される第2の抗原は、患者内に存在し得る。第2の抗原は自身の抗原であり得、そして自身の抗原はガン抗原であり得る。ガン抗原は、145kD腫瘍タンパク質、42kD腫瘍糖タンパク質、または糖脂質のいずれかであり得る。ガン抗原を認識および結合し得る第2の結合部位は、任意の以下のハイブリドーマより産生されるモノクローナル抗体由来の結合部位であり得る：42H8(HB11830)、35E6(HB11769)、または36H3(HB11768)。

ガン抗原はまた、扁平上皮細胞腫瘍抗原、300,000Daの糖タンパク質乳ガン抗原、または195kD腫瘍関連抗原であり得る。ガン抗原はまた、腫瘍関連ガングリオシドであり得る。

ガン抗原は、腫瘍関連ガングリオシドGD3、GD2、GM3、GM1、G2、6C、Le<sup>a</sup>、またはLe<sup>x</sup>のうちの1つであり得る。

本発明の第2の抗原は、以下のウイルス群のウイルスにより発現されるウイルス抗原であり得る：HIV、HAV、HBV、HCV、HPV、HSV、CMV、EBV、およびインフルエンザウイルス。

ウイルス抗原は、HIV抗原、特定的にはHIV糖タンパク質、より特定的にはHIV糖タンパク質gp120、さらにより特定的には、HIV糖タンパク質抗原gp120のV3-PN D領域であり得る。

ウイルス抗原は、HAV抗原であり得、そして抗HAVモノクローナル抗体K3-4C8およびB5-B3に結合し得る。

ウイルス抗原は、HBV抗原、特に、HBVタンパク質のpre-S1、pre-S2、またはS領域をコードするドメイン中に位置するHBV抗原であり得る。

ウイルス抗原は、HCV抗原、特に、E1またはE2HCV抗原のいずれかであり得る。

ウイルス抗原は、HPV抗原、特に、HPV型抗原であり得る。

ウイルス抗原は、HSV抗原、特に、HSVのエンベロープ糖タンパク質に対する抗原、さらにより特定的には、抗体クローニ番号A19080023A、A19090023A、A1910023A、A19170023A、およびA19180023Aに対する抗原であり得る。

ウイルス抗原は、CMV抗原、特に即時初期非構造的抗原、CMVに対する即時初期、初期または後期抗原、または主要CMVエンベロープ糖タンパク質に対する抗原gB (gp UL 55) であり得る。さらに特定的には、抗原は、クローニ番号A28020069PおよびA28030069Pと同定された抗体、および主要CMVエンベロープ糖タンパク質gB (gp UL 55) に対する抗体に結合し得る。

ウイルス抗原は、EBV抗原、特に、EBV潜在膜タンパク質、エプスタイン・バーグウイルス核抗原-2、またはウイルスカプシド抗原 (VCA) であり得る。

ウイルス抗原は、インフルエンザウイルス抗原、特に、インフルエンザAまたはインフルエンザBウイルスに対する抗原、さらに特定的には、インフルエンザAウイルス抗体クローニ番号A60010044PまたはインフルエンザBウイルス抗体クローニ番号A60020044Aに結合し得る抗原であり得る。

第2の抗原は、真菌類の抗原であり得、より特定的には、第2の抗原はC. neoformansの真菌抗原ポリ多糖であり得る。

第2の抗原は、寄生虫の抗原、さらに特定的にはマラリア寄生虫に対する抗原、なおさらに特定的にはマラリアペプチドPfEMP3であり得る。

第2の抗原は、毒素、より特定的に破傷風毒素、さらにより特定的には破傷風毒素の重C鎖フラグメントであり得る。

第2の抗原はまた、二重特異性抗体を一次投与した患者において存在し得ない。

#### 発明の詳細な説明

現在、Fc<sub>γ</sub> RIIIおよび第2の抗原を認識し、そして結合する二重特異性抗体の投与が、ヒトにおいて第2の抗原に対する免疫応答を促進し得ることが発見されている。免疫応答は、第2の抗原に対する抗体の形成を含む。第2の抗原は、細胞表面に存在し得、自己抗原（ガン抗原を含む）であり得る。

本明細書中で使用される用語「免疫応答」は、液性および細胞媒介性の免疫応

答の両方をいう。免疫系の液性の支流は、B細胞と抗原との相互作用、およびその後の増殖、ならびに抗体分泌プラズマ細胞への分化を含む。抗体は、抗原に結合し、そしてそれを中和するかまたはその排除を促進することにより、液性応答のエフェクター分子として機能する。抗体は抗原を架橋し得、より容易に食細胞により消化される集団を形成する。抗体の抗原への結合はまた、補体系を活性化し得、外来の生物を含む、抗体が結合する細胞の溶解をもたらす。抗体はまた、毒素またはウイルス粒子をコーティングし、そして宿主細胞への結合を防止することにより、毒素またはウイルス粒子を中和し得る。

免疫応答の細胞媒介性支流は、エフェクターT細胞が抗原に応答して生成されたときに起こる。Tヘルパー細胞(T<sub>H</sub>)および細胞傷害性Tリンパ球(CTL)の両方が、細胞媒介性免疫反応におけるエフェクター細胞として働く。T<sub>H</sub>細胞により分泌されるリンホカインは、種々の食細胞の微生物の貧食および殺傷を活性化し得る。活性化された細胞傷害性Tリンパ球は、変化した自己細胞（ウイルス感染細胞および腫瘍細胞）を殺傷することにより、細胞媒介性免疫反応に関与する。ナチュラルキラー(NK)細胞の抗腫瘍活性は、NK細胞が抗原特異的T細胞レセプターまたはCD3を発現せず、NK細胞による抗原認識がMHC拘束性でなく、NK細胞応答がいかなる免疫学的記憶をも生成せず、そしてNK細胞が腫瘍細胞およびウイルス感染細胞に対して特に敏感であることが示されているので、CTLの抗腫瘍活性とは異なる。NK媒介性細胞傷害性は、CTL媒介性細胞傷害性と類似のプロセスを含み得る。

細胞媒介性免疫応答の支流は、抗体依存性の細胞媒介性細胞傷害性(ADCC)と呼ばれる。種々の細胞（NK細胞、マクロファージ、単核白血球、好中球、および好酸球を含む）が、ADCCを示す。これらの細胞は、Fc<sub>γ</sub> RIIIのような抗体のFc部分に対するレセプターを発現する。ウイルスに感染した細胞のADCC殺傷は、抗ウイルス抗体とマクロファージとの同時投与により証明されている。ADCCによる標的細胞の殺傷は、多くの異なる機構を含む。標的細胞への結合の際、マクロファージは、より代謝的に活性になり、そして標的細胞を貧食する。活性化された単核白血球およびNK細胞のような他の細胞は、腫瘍壞死因子およびパーホリン(perforin)（標的細胞の膜の完全性に損傷を与える分子）を分泌し得る。

本明細書中で使用される用語「患者」は、細胞表面でFc<sub>γ</sub> RIIIを発現し得る哺乳動物（ここで、この哺乳動物は、本発明の方法により処置可能ないくつかの疾患により、現時点で苦痛をもたらされるか、または苦痛をもたらされる可能性がある哺乳動物）をいう。このような疾患には、例えば、ガン、ウイルス感染、細菌感染、寄生虫感染、真菌感染、または毒素中毒がある。

本明細書中で使用される用語「投与」は、本発明の方法において有用な二重特異性抗体の患者への導入をいい、そしてより具体的には、患者において免疫応答の誘導に対して有効な量の投与を意味し、この投与は単一用量または連続用量の一部としてのいずれかで与えられる。有効量は、処置されるべき個体の健康的および肉体的な状態、抗体およびT細胞応答を形成する個体の免疫系の許容量、所望される保護の度合、処方、および当業者に公知の他の関連因子に依存して変化する。有効量は、当業者による日常的試験を通して決定され得る範囲内である。

二重特異性抗体の投与に対する薬学的に受容可能なキャリアは、それ自身この組成物を与えられる個体に有害な抗体の産生を誘導せず、かつ不適切な毒性を伴わずに投与され得る任意の薬学的キャリアをいう。適切なキャリアは大きく、ゆっくりと代謝される巨大分子（例えば、タンパク質、多糖類、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、アミノ酸重合体、アミノ酸共重合体、および不活性ウイルス粒子）であり得る。このようなキャリアは当業者に周知である。代表的な薬学的に受容可能な塩には、無機酸塩（例えば、塩酸塩、臭化水素酸塩（hydrobromide）、リン酸塩、硫酸塩など）；有機酸塩（例えば、酢酸塩、プロピオン酸塩、マロン酸塩、安息香酸塩など）が含まれる。薬学的に受容可能な賦形剤の完全な考察は、Remington's Pharmaceutical Sciences(Mack Pub.Co., NJ 1991)より入手可能である。治療的組成物は、薬学的に受容可能なビヒクル（例えば、水、生理食塩水、グリセロールおよびエタノール）を含み得る。さらに、補助物質（例えば、湿潤剤または乳化剤）、pH緩衝化物質などが、このようないびきくル中に存在し得る。代表的には、治療的組成物は、注入可能物として（液体溶液または懸濁液のいずれかとして）調製される。溶液、または懸濁液に適切な固体形態もまた、注入の前に液体ビヒクル中に調製され得る。

本明細書中で使用される用語「同時投与」は、第2の治療剤と本発明の化合物

を組み合わせて投与することをいう。同時投与は、例えば、二重特異性抗体を含む治療剤の混合物を投与することにより、同時にあり得、または短期間内に別々に薬剤を投与することにより達成され得る。

本明細書中で使用される用語「二重特異性抗体」は、単一の抗体分子内に2つの異なる抗原に対する結合部位を持つ抗体をいう。当業者により、標準的な抗体構造に加えて2つの結合特異性を有する他の分子が構築され得ることが認識される。このような構造は、本明細書中で考察され、そして本発明の範囲内で有用であることが意図される。二重特異性抗体による抗原結合は、同時にまたは連続して起こり得ることが、さらに認識される。トリオーマ(Trioma)およびハイブリッドハイブリドーマは、二重特異性抗体を分泌し得る細胞株の2つの例である。ハイブリッドハイブリドーマおよびトリオーマにより產生される二重特異性抗体の例は、米国特許第4,474,893号およびShiら、J. Immun. Meth. (1991)141:165-75に開示されている(これらの開示は、両方とも本明細書中に参考として援用される)。本発明の方法において有用な二重特異性抗体は、Ringら、Breast Epithelial Antigens:Molecular Biology to Clinical Applications, Ceriani編(Plenum Press, NY 1991)91-104頁に記載のような下記の方法により作製され得る。二重特異性抗体結合物は、Staerzら、Nature(1985)314:628-631およびPerezら、Nature(1985)316:354-356に記載の化学的手段により、構築されている。

本明細書中で使用される用語「抗原」は、適切なT細胞抗原レセプターまたは抗体に結合し得る分子をいう。抗原にはタンパク質、タンパク質フラグメント、単純および複合炭水化物、単純中間体代謝産物、糖、脂質、ホルモン、リン脂質、および核酸が含まれ得る。エピトープは、抗体またはT細胞抗原レセプターにより認識され、そして結合され得る抗原部分である。所定の抗原は1つより多いエピトープを有し得ることが認識される。

本明細書中で使用される用語「Fc<sub>γ</sub> RIII」は、文献中でCD16としても知られている細胞表面タンパク質をいう。本明細書中で使用されるFc<sub>γ</sub> RIIIは細胞表面に存在するイソ型Aをいい、そして細胞が循環中に放出するイソ型Bと区別される。Fc<sub>γ</sub> RIIIは、50~70kDの範囲内の分子量を有する。Fc<sub>γ</sub> RIIIは、単量体のIgGより凝集したIgGに効果的に結合する。Fc<sub>γ</sub> RIIIは、IgGのFc部分に対する低親和

性

レセプターであり、IgGと $2 \times 10^{-6}$ Mの親和性で結合する。Fc<sub>γ</sub>RIIIは、NK細胞、 $\gamma/\delta$ Tリンパ球、マクロファージ、好酸球、および好中球上で発現されている。NK細胞は、抗体のFc領域（それ自身が標的細胞の表面上の抗原に結合する）に結合することにより標的細胞に付着するために、Fc<sub>γ</sub>RIIIを用い得る。NK細胞上のFc<sub>γ</sub>RIII分子に対する抗体のFc部分の結合は、NK細胞を活性化して標的細胞を溶解する。

本明細書中で使用される用語「抗体」は、また、親抗体の抗原結合機能を保つ抗体を含む。親抗体は、特異的抗原に対する免疫応答において生成される最初の抗体である。抗体にはまた、例えば、ポリクローナル、モノクローナル、キメラ、ヒト化、ハイブリッド（二重特異性とも呼ばれる）、および改変された抗体も含まれ得る。

本明細書中で使用される用語「モノクローナル抗体由来の結合部位」は、モノクローナル抗体と同一または相同的CDRを有する第2の抗体または抗体フラグメント内の結合部位を意味する。相同的CDRは、各CDRの一次配列が抗体と少なくとも50%同一であり、かつこれらのCDRによって形成される結合部位が、モノクローナル抗体と同じエピトープに結合する、抗体由来の1セットのCDRを含むことが理解されるべきである。

本明細書中で使用される用語「キメラ抗体」は、重鎖および／または軽鎖が融合タンパク質である抗体をいう。代表的には、鎖の定常ドメインは1つの特定の種および／またはクラス由来であり、そして可変ドメインは異なる種および／またはクラス由来である。また、重鎖または軽鎖のいずれかまたは両方が異なる供給源の抗体中の配列を模倣している配列の組み合わせで構成されている任意の抗体（これらの供給源が異なるクラスであろうが、起源の異なる種であろうが、そして融合点が可変／定常境界であろうがなかろうが）も含まれる。従って、可変領域および定常領域のどちらも既知の抗体配列を模倣しない抗体の产生が可能である。その上、例えば、可変領域が特定の抗原に対してより高い特異的親和性を有するか、または定常領域が補体結合の増強を導き得る抗体の構築、あるいは特

定の定常領域が有する特性において他の改良を行なうことが可能となる。キメラ抗体の例は、米国特許第4,816,397号および米国特許第4,816,567号において考察

されている（これらの開示は、両方とも本明細書中に参考として援用される）。

本明細書中で使用される用語「ヒト化抗体」は、一次配列が、ヒトにおける抗体の免疫原性をより少なくするために改変された抗体をいう。代表的には、ヒト化抗体は、少なくともヒト免疫グロブリン配列由来の免疫グロブリンのフレームワーク領域の部分由来である。ヒト化抗体はキメラ抗体の一つのタイプである。

抗体のヒト化は、CDRグラフティングのような当該分野で公知のプロセスにより達成され得、そして、例えば、米国特許第5,225,539号（この開示は、本明細書中に参考として援用される）に記載される。CDRグラフティングにおいて、所望の抗原結合特異性を有するモノクローナル抗体のCDR（代表的にはマウスモノクローナル抗体）が、そうでなければヒト免疫グロブリン中のCDRを置き換えるために使用される。ヒト化は、また、当該分野で張り合わせ（veneering）として公知のプロセスにより達成され得、そして、例えば、WO 92/22653およびEP 05 19 596（この開示は、本明細書中に参考として援用される）に記載される。張り合わせは、非ヒトCDR領域配列により認識される抗原に対する非ヒト抗体の所望の結合特異性をまだ保持しながら、ヒトにおける非ヒト抗体の免疫原性をより少なくするために、マウスまたは他の非ヒトモノクローナル抗体の可変領域のフレームワーク部分におけるアミノ酸を置換することを含む。

ヒト化抗体は、全てのCDR領域または実質的に全てのCDR領域が非ヒト免疫グロブリンのCDR領域に一致し、かつFR領域の少なくともいくつかの部分がヒト免疫グロブリンの配列である、目的の抗原を認識し、そして結合し得る、全ての可変ドメインまたは少なくとも2つの可変ドメインを含む実質的に完全な抗体分子を含み得る。ヒト化抗体は、また、少なくとも免疫グロブリンの定常領域（Fc）、代表的にはヒト免疫グロブリンの定常領域部分を含み得る。

ヒト化抗体のFR領域およびCDR領域は、親の配列に正確に一致する必要はない。例えば、移入CDRまたはFRでは、その部位のCDRまたはFR残基が、FRまたは移入CDR配列のいずれかに対して正確に一致しないように、少なくとも一つの残基の

置換、挿入、または欠失により変異を起こし得る。しかし、このような変異は、広範囲ではない。通常、任意の特定の移入CDRの一次配列の少なくとも50%は、親抗体における配列と同一である。

本明細書中で使用される用語「改変された抗体」は、脊椎動物抗体において天然に存在するアミノ酸配列が変化している抗体をいう。組換えDNA技術を用いて、抗体は、所望の特徴を得るために再設計され得る。可能なバリエーションは多く、そして1つ以上のアミノ酸の変化から、領域（例えば定常領域）の完全な再設計までの範囲である。定常領域における変化は、一般には、所望の細胞プロセスの特徴（例えば、補体結合における変化）を達成するために行なわれる。補体結合において、抗体のFc部分は凝集して補体系を活性化し、膜と相互作用する。膜において、抗体のFc部分は、Fc細胞表面レセプターに結合して、エフェクター細胞、および他のエフェクター機能の細胞溶解成分の放出を活性化する。抗体の可変領域の変化は、抗体がより高い親和性で抗原に結合するように作成された場合のように、抗原結合の特徴を改変するために行なわれ得る。抗体はまた、特定の細胞または組織の部位への分子または物質の特異的な送達を助けるために操作され得る。所望される改変は、組換えDNA技術、および部位特異的突然変異誘発を含む分子生物学において公知の技術によって行なわれ得る。

一本鎖抗体すなわちsFvは、所望の抗原および結合機能の保存を許容する連結部分を結合し得る、抗体の重鎖および軽鎖の結合領域を製造することにより調整される抗体をいう。一本鎖抗体の決定および構築は、例えば、米国特許第4,946,778号に記載される（この開示は、本明細書中に参考として援用される）。sFvは、一方のドメインのカルボキシ末端と他方のドメインのアミノ末端との間の距離を繋ぐポリペプチドリンカーによって連結される少なくとも2つのポリペプチドドメインを含む。CDRのセットを含む各ポリペプチドドメインのアミノ酸配列は、CDRが与える目的の抗原に対する免疫学的結合を伴って、FRのセットの間に挿入される。このsFvは、抗体（代表的にはモノクローナル抗体）由来の結合部位を有する。同時係属中の米国出願番号第07/831,967号および第8/133,804号（これらの開示は、本明細書中に参考として援用される）に記載されるように、sFvのポ

リペプチド鎖は、予め選択された抗原上の異なるエピトープ、または2つの異なる予め選択された抗原上の異なるエピトープを結合させ得る。

抗体フラグメントを含む分子もまた、この抗体フラグメントが親抗体の抗原結合機能を保持すれば、本発明の方法において使用され得る。 $F_{ab}$ 、 $F_{ab \cdot 2}$ 、および $Fv$

のような抗体フラグメントおよび他の抗体フラグメントは定義の範囲内であり、本発明の方法において有用である。抗体フラグメントのこの定義において、また含まれるものは、本明細書中の上記のような、一本鎖抗体である。

本明細書中で使用される用語「抗体フラグメント」は、また、抗原のエピトープに対して結合するために十分な、少なくとも1つの抗体結合部位より構成されるポリペプチドまたはポリペプチド群をいう。このような抗体フラグメントは、抗体の抗原との結合を可能にする抗原のエピトープの特性に完全に相補的な内部表面形状および電荷分布を含む3次元の結合空間を有する。用語抗体フラグメントは、また、 $F_{ab}$ 、 $F_{ab \cdot 2}$ 、 $Fv$ のようなフラグメントを含み、そして親モノクローナル抗体の抗原結合機能を保持する他の抗体フラグメントもまた、本発明により具体化されると考えられる。この $F_{ab}$ 領域は、重鎖および軽鎖の分枝部分を含む配列に対してほぼ同等であるか、または類似であり、そして特定の抗原に対しては免疫学的結合を表すことが示されているが、エフェクターFc部分が欠如している重鎖および軽鎖の部分をいう。 $F_{ab}$ は、普通 $F_{ab}$ または $F_{ab \cdot 1}$ として知られている1つの重鎖および1つの軽鎖の凝集物、ならびに示された抗原または抗原ファミリーと選択的に反応し得る2つの重鎖および2つの軽鎖( $F_{ab \cdot 2}$ という)を含むテトラマーを含む。 $F_{ab}$ 抗体は、上述のサブセットアナログ、すなわち「ハイブリッド $F_{ab}$ 」「キメラ $F_{ab}$ 」および「改変された $F_{ab}$ 」に分類され得る。抗体の $F_{ab}$ フラグメントを產生する方法は、当業者に公知であり、そして例えば、タンパク質加水分解、および組換えDNA技術による合成を含む。

本明細書中で使用される用語「モノクローナル抗体」は、单一のハイブリドマにより、またはKohlerおよびMilstein、Nature,(1975)256:495-497に記載のよう組換え技術により產生され得る均一な軽鎖および重鎖の組成の抗体をいう。

モノクローナル抗体は、単一のエピトープを認識し、そして均質な抗体集団を含む抗体組成物をいう。用語モノクローナル抗体は、抗体の特定の種または供給源に制限されることも、作製された様式により制限されることも意図されない。この説明を通じてのモノクローナル抗体の使用に対する参考は、天然の、または本来の抗体ならびにヒト化およびキメラ抗体の使用を含むことが意図される。抗体のフラグメントは、親モノクローナル抗体から由来し得、またはそれから生成され得る。これらの抗体またはフラグメントの組換え形態は、当該分野における従来の任意の発現系（例えば、細菌のような原核生物、あるいは酵母、昆虫細胞または哺乳動物細胞のような真核生物を含む）において產生され得る。

本発明の方法において有用な分子中に存在する特定のアミノ酸配列に関する同一性または相同性は、必要であれば相同性の最大パーセントを達成するために配列を整列させ、そしてギャップを導入した後、特定残基と同一の候補配列におけるアミノ酸残基の割合をいう。N末端、C末端あるいは特定配列への内部の伸張、欠失、または挿入は、相同性に影響を及ぼすと解釈されない。本発明において必要とされる全ての配列アラインメントは、このような最大相同性アラインメントである。アラインメントは、手動でまたはこの仕事に特異的なコンピューターソフトウェアプログラムの助けを用いて、行われ得る。非均質移入抗体残基は、移入配列およびコンセンサス配列を整列させた後、コンセンサス配列内の類似のまたは一致する位置でのアミノ酸残基と同一でない残基である。

本発明の方法に有用な抗体および二重特異性抗体を产生するために、1つ以上の以下の技術を使用し得る。ハイブリッドハイブリドーマ（テトラドーマまたはQuadromas®とも称される）は、当該分野で公知の種々の技術を用いて、種々の培地において二重特異性抗体を产生するために使用され得る。これらのハイブリッドハイブリドーマおよび二重特異性抗体の产生は、親ハイブリドーマの产生、とのハイブリドーマの融合、ハイブリドーマ細胞の選択、所望の二重特異性抗体を分泌しているハイブリッドハイブリドーマの選択、および二重特異性抗体の精製を含む。二重特異性抗体の产生方法は、WO 92/08802および米国特許番号第4,474,893号および第4,714,681号（この開示は、本明細書中に参考として援用さ

れる)に記載されている。親の細胞株は、標準の細胞融合材料および方法を用いて融合され得る。融合は、ポリエチレングリコールを含む種々の融合誘導因子(fusogen)を用いることで遂げられ得る。使用される技術は、KohlerおよびMilstein、Nature(1975)256:495-497により記載される。ハイブリッドは、蛍光励起性のセルソーターを用いて、融合細胞の混合物より単離され得る。ハイブリッド細胞を選択するために使用されるセルソートウインドウをセットするための標準技術が使用され、これは、Karawajewら、J.Immunol.Methods(1987)96:265-270に記載

される。励起された細胞を同定した後、これらを、細胞コロニーのクローナル増殖を達成するために、適切な増殖培地とともに約1細胞／1ウェルの密度で、マルチーウェルプレート中に希釈し得る。抗体を分泌しているハイブリッド細胞(好ましくは最も高い抗体レベルを産生しているハイブリドーマ、トリオーマ、およびハイブリッドハイブリドーマ)の検出および選択は、例えば、米国特許番号第5,169,774号およびWO 90/03186に記載のように成就され得る。適切な条件下において、抗体産生細胞が十分な時間ウェル中で培養され、そしてクローナルなコロニーを形成した後、抗体産生を測定し得る。

適切な細胞を選択した後、これらを、抗体産生に好都合などの種々の条件下で、培養し、そして刺激し得る。例えば、米国特許番号第5,096,816号;WO 89/01027;WO 89/01028;WO 89/01029;WO 90/03429;WO 90/03430;Velezら、J.Imm.Meth.(1986)86:45-52;Reuvenyら、J.Imm.Meth.(1986)86:53-59;およびReuvenyら、J.Imm.Meth.(1986)86:61-69を参照のこと。

本明細書中で使用される用語「3G8」は、ハイブリドーマ3G8により産生されるモノクローナル抗体をいう。3G8は、凝集したIgGのFcフラグメントに結合するFc<sub>γ</sub>RIIIを認識し、そして結合する。ハイブリドーマ3G8は、Unkelessら、J.Exp.Med.(1979)150:580-596に最初に開示された。

本明細書中で使用される用語「自己抗原」は、患者のゲノムによりコードされ、そして患者に存在する抗原をいう。一般に、免疫系は自己抗原には応答せず、そしてこれらに寛容の状態を発達させる。免疫学的寛容は、免疫系の適応性応答

を反映する。自己抗原を認識するT細胞クローニングは、発達の過程で削除されると考えられる。自己抗原、特にガン細胞上に存在する自己抗原が、免疫系により認識されない場合があることに対する少なくとも3つの他の理由が存在すると考えられる。いくつかの場合において、自己抗原の構造は、マクロファージがこれらの抗原を貧食し、そしてプロセスすることを困難にし得る。他の場合において、自己抗原が存在する細胞は、抗原を提示するその能力を欠如し得る。最後に、いくつかのガン細胞は、免疫抑制性サイトカインを分泌し、それにより、ガン細胞表面上に存在する自己抗原の認識を妨げると考えられる。

本明細書中で使用される用語「ガン抗原」は、細胞のガンの状態についてのマ

ーカーとして働き得るガン細胞の表面に発現される抗原をいう。これらの抗原のいくつかは、疾病の進行を追跡するために使用され、そしてガン細胞に独特のものであるか、またはガン細胞上に多数存在する。ガン抗原は、このように、正常細胞からガン細胞へと分化する分子マーカーとして働く。ガン抗原は、本発明の方法において、ガン細胞により発現された細胞傷害性細胞抗原およびガン抗原に対して特異的な二重特異性抗体の投与により、免疫応答の標的化誘導において有用である。

ガン抗原には、限定はされないが、c-erbB-2(erbB-2)、ならびに構造的および機能的に増殖因子レセプターと関連する他の抗原が含まれる。erbB-2抗原は、上皮成長因子レセプター(EGFレセプター)に関連し、そしてまた当該分野においてc-neuまたはHER-2といわれている。erbB-2タンパク質産物である、p185は、乳ガン細胞(gp30)により分泌される明確な30kDの因子に結合する。このファミリー(EGFレセプターと関連する)における抗原の顕著な特徴は、これらのタンパク質産物の外部ドメインにおいてシステイン残基が豊富な2つの領域の存在である。ガン抗原c-erbB-2に対する抗体は、例えば、ハイブリドーマ細胞株520C9、HB8696から得られ得る。ガン原遺伝子c-erbB-2の新鮮なヒト腫瘍または腫瘍細胞株における発現は、Krausら、EMBO J.(1987)6:605-610;Hynesら、J.Cell Biochem.(1989)39:167-173;Fukumotoら、PNAS(1988)85:6846-50;Gulllickら、Int.J.Cancer(1987)40:246-254;Nataliら、J.Int.Cancer(1990)45:457-461;Zajchowskiら、C

ancer Res.(1988)48:7041-7047に記載のように広く研究されている。ヒト乳ガン、卵巣ガン、および大腸ガンの30~40%がerbB-2を発現していることが見出されている。乳ガンおよび卵巣ガンにおける、ならびに患者に対する少数の予後における、erbB-2の増幅とerbB-2の過剰発現との間の相互関係は、種々のグループにより研究されてきた。erbB-2の過剰発現と関与する他のヒト腫瘍および細胞株には、神経芽腫、肺ガン、甲状腺ガン、肺臓ガン、前立腺ガン、腎臓ガン、および消化管のガンが含まれる。モノクローナル抗体を用いたerbB-2陽性腫瘍の局在化または増殖阻害は、Hsieh-Maら、Cancer Res.(1992)52:6832-39に記載のようなインビトロモデルにおいて報告されている。

本発明の方法において使用し得る他のクラスのガン抗原は、非酵素的な機能の

腫瘍胎児性タンパク質である。この抗原は、種々の腫瘍において見出され、そして腫瘍関連抗原としばしばいわれる。胎児性ガン抗原(CEA)、およびα-フェトプロテイン(AFP)が2つの例である。AFPレベルは、肝細胞ガンを有する患者において上昇する：肝臓ガンを有する患者の69%が血清中に高レベルのAFPを発現する。CEAは、大腸の腺ガン、ならびに肺および尿生殖路のガンにおいて見出される200kDの血清糖タンパク質である。大腸ガンにおけるCEAの過剰産生は、細胞間接着力の正常な作用を破壊し得、腫瘍形成の初期段階におこるように、細胞の運動性がより大きくなり、そして分化がより減少すると仮定されている。

ガン抗原のなお別のクラスは特定の腫瘍に対して独特の抗原であり、本明細書中では「腫瘍特異的抗原」という。Udonoら、(1993)J.Exp.Med.176:1391-96に記載のように（この開示は、本明細書中に参考として援用される）、Meth A肉腫由来の熱ショックタンパク質70(hsp70)調製物を用いたマウスのワクチン接種は、Meth A肉腫でのその後の実質的チャレンジに対してマウスを免疫性にする。正常組織由来のhsp70でのワクチン接種も、他の腫瘍供給源から調製したhsp70でのワクチン接種も、Meth A肉腫でのチャレンジから保護しなかった。Udonoらは、抗原ペプチドはhsp70によりシャペロン化され、そしてこれらの抗原は腫瘍特異的であったと考える。正常ヒト細胞は、アクチンのようなハウスキーピングタンパク質を含む多くの型のタンパク質において、酵素のような代謝タンパク質におい

て、および細胞表面タンパク質において、サイレントな変異を含み得る。これらの変異したタンパク質は、代表的には、対応する免疫応答を用いた免疫系による検出を避ける。なぜならば、これらは1つの特定の細胞に対して独特であるからである。ガンのセッティング（ここで、1つ以上の腫瘍において1つの不死化細胞は数百万のクローナルな派生物のもととなる）において、サイレントな変異は、もはやガン細胞を認識し、そしてガン細胞に応答するための免疫系のための機構を提供し得る。本発明の方法（ここで、二重特異性分子は、erbB-2のようなガン抗原を認識し得、そして結合し得る）は、このクラスの腫瘍特異的抗原の免疫応答をまた誘導し得ると考えられる。1つの特定の説明に限定されないが、マクロファージによる貧食のための標的化ガン細胞は、2B1のような二重特異性分子を用いて、hsp70またはhsp90のようなタンパク質における腫瘍特異的抗原を含むこ

れらのペプチドの提示により、腫瘍細胞ペプチドのプロセシングをもたらすと考えられる。

CEAに対する抗体は、U.K.2 276 169（この開示は、本明細書中に参考として援用される）に記載されたように開発されてきた。CEAに対する抗体は、CEAに対するマウスモノクローナル抗体由来のヒト化抗体分子である。これらの抗体は、マウスの親抗体A5B7の可変ドメインの少なくとも1つのCDRの抗原結合部位を用いてCEAに対する特異性を保つ。A5B7の可変領域の配列もまた、U.K.2 276 169に開示される。

本発明の方法において有用な他のガン抗原に対する抗体は、145kDのガン抗原に対する42H8抗体、全てerbB-2ガン抗原に対する452F2、741F8、520C9、759E3、113F1および454C11抗体、40kDのガン抗原に対する387H9抗体、種々のガンの40kD、60kD、および100kDのガン抗原上に見出されるエピトープに対する113F1抗体、全て42kDのガン抗原に対する317G5、34F2、650E2、および35E6抗体、全て55kDのガン抗原に対する266B2、106A10、および260F9抗体、66kDのガン抗原に対する33F8抗体、75kDのガン抗原に対する9C6抗体、80kDのガン抗原に対する35E10抗体、糖脂質ガン抗原に対する140A7および36H3抗体、全て高分子量（HMW）ムチンガン抗

原に対する788G6、200F9、697B3、120H7、203E2、254H9、245E7、および2G3抗体、別のHMWムチンガン抗原(HMWムチンIIと呼ばれる)に対する369F10抗体、p-糖タンパク質ガン抗原に対する15D3抗体、大腸ガンおよび同様に他のガンを含むガン由来の種々のガン抗原に対する421E8、310B7、32A1、219F3、42E7、および388D4抗体を含む。

モノクローナル抗体140A7および36H3の両方は、MCF-7乳ガン細胞由来のクロロホルム／メタノール抽出により抽出される糖脂質に結合する。36H3は、優先的に中性の糖脂質に結合し、そして140A7は、優先的にモノシアロガングリオシド分画に結合する。これらのモノクローナル抗体は、36H3の結合が過ヨウ素酸ナトリウムでの標的糖脂質の酸化に対して感受性がなく、一方、140A7の結合が糖脂質の過ヨウ素酸処理により減少するという点で、さらに区別される。

15D3は、p-糖タンパク質(またはmdr)に結合し、その発現は、化学療法に耐性の特定のガン細胞においてしばしば観察される、多剤(multi-drug)耐性に関

連する。p-糖タンパク質RNAまたはタンパク質は、数種のガンで検出されており、そしてp-糖タンパク質の発現は、米国特許第4,912,039号および同第5,206,352号に記載されるようにガンの進行と関連し、その開示の両方は、本明細書中に参考として援用される。

免疫応答が本発明の方法において生成され得る他のガン抗原としては、以下のガン抗原が挙げられる：ヒト羊水から単離され、そして米国特許第5,324,822号(本明細書中で参考として援用される)に記載のヒト血清においてCA195を測定するために有用である、CA195腫瘍関連抗原様抗原；米国特許第5,306,811号(本明細書中で参考として援用される)に記載の女性の尿由来の扁平上皮細胞の癌腫様抗原；および米国特許第4,960,716号(本明細書中で参考として援用される)に記載の正常および良性の乳房上皮細胞膜の表面上、および乳ガン細胞上に見出される糖タンパク質抗原。

本発明の方法において有用である他のガン抗原に対する抗体としては、145kDのガン抗原に対する抗体42H8、42kDのガン抗原に対する35E6、糖脂質のガン抗原に対する36H3、が挙げられる。36H3に対するモノクローナル抗体は、MCF-7乳ガ

ン細胞からクロロホルム／メタノール抽出によって抽出された糖脂質に結合する。  
。

免疫応答が本発明の方法を用いて生成され得る他のガン抗原としては、以下のガン抗原が挙げられる：ヒト羊水から単離され、米国特許第5,324,822号（本明細書中で参考として援用される）に記載のヒト血清においてCA195を測定するために有用である、CA195腫瘍関連抗原様抗原；米国特許第5,306,811号（本明細書中で参考として援用される）に記載の女性の尿由来の扁平上皮細胞の癌腫様抗原；および米国特許第4,960,716号（本明細書中で参考として援用される）に記載の正常および良性の乳房上皮細胞膜の表面上、および乳ガン細胞上に見出される糖タンパク質抗原。

本明細書中で使用される用語「ガンガングリオシド」は、原形質膜中に位置する腫瘍細胞の特異的なスフィンゴ糖脂質成分をいう。ガンガングリオシドは、シアル酸として知られる特定の型の酸性炭水化物を包含する。多くの腫瘍細胞は、その原形質膜における特定のガングリオシドによって特徴付けられる。ガングリオシドに対する特異的なモノクローナル抗体は、例えば、米国特許第5,389,530

号（本明細書中に参考として援用される）に記載されている。

本明細書中で使用される用語「2B1」は、本発明の方法において有用な二重特異性モノクローナル抗体を産生し得る、ハイブリッドハイブリドーマをいう。2B1（CRL 10197）は、親ハイブリドーマ520C9（HB 8696）と3G8との融合による産物である。親に対する2B1の投与により、NK細胞およびCD16のFc<sub>γ</sub> RIII Aイソ型（本明細書中で、以後「Fc<sub>γ</sub> RIII」という）を発現するマクロファージによるerbB-2（+）腫瘍溶解が促進される。

実施例のように、以下は二重特異性抗体2B1（CRL 10197）を作製するプロセスを記載する。癌原遺伝子産生物cerbB-2を認識するハイブリドーマ520C9（HB 8696）およびヒトFc<sub>γ</sub> RIIIを認識するハイブリドーマ3G8を、蛍光活性色素で染色し、そしてPEGを用いて融合してハイブリッドハイブリドーマを形成した；これらのハイブリッドハイブリドーマを、セルソーター上で2重の蛍光によって単離した。上清が、ヒト全単核細胞によってSK-Br-3乳ガン細胞の溶解を促進する培養物

を、サブクローニングのために選択した。クローン2B1により產生された免疫グロブリンの種は、陰イオン交換クロマトグラフィーによって、親抗体520C9、二重特異性抗体を含む中央のピーク、および親抗体3G8に分離された。二重特異性ピークを、さらに陽イオン交換クロマトグラフィー上で、主要ピークと副次的ピークに分離した。主要ピークは、SDS-PAGE、等電点電気泳動、腫瘍細胞およびエフェクター細胞の両方に対する免疫蛍光結合、および標的された細胞溶解を促進するその能力に基づいて二重特異性を示した。副次的ピークもまた、ゲル基準によって二重特異性を示したが、腫瘍細胞結合および細胞溶解標的化能力を失した。二重特異性抗体の副次的な種は、520C9活性を立体的に阻害するが3G8結合部位を阻害しない様式でヒンジ領域でさらに高度にグリコシル化され得る。精製2B1二重特異性抗体は、ヒトNK細胞（大顆粒リンパ球またはLGLとも呼ばれる）およびマクロファージにより、c-erbB-2陽性の乳ガン細胞、卵巣ガン細胞、および肺ガン細胞の溶解を促進する。本明細書中で使用される用語「2B1」はまた、2B1ハイブリッドハイブリドーマより產生された二重特異性抗体といわれ得ることが理解されるべきである。

2B1由来の二重特異性抗体は、Hsieh-Maら、Cancer Research (1992) 52 : 683

2-39に記載されるように、インビトロにおけるerbB-2陽性腫瘍細胞の特異的溶解を促進することが示されている。エフェクターとしてヒト単核細胞を、そして標的としてSK-Br-3ヒト乳ガン細胞を用いた短期<sup>51</sup>Cr放出アッセイにおいて、2B1の親抗体のどちらも特異的な溶解を媒介しなかったが、2 ng/mlの濃度での二重特異性抗体2B1は、20:1のエフェクター／標的比で半量最大溶解 (half-maximal lysis) を起こし、そして2 ng/mlの2B1は、40:1のエフェクター／標的比で半量最大溶解を起こす。2B1 F<sub>ab'2</sub>フラグメントの細胞傷害性標的活性は、全二重特異性抗体の細胞傷害性標的活性と同じである。全2B1の活性は、アッセイが100%自己由来のヒト血清中で実施された場合、減少しなかった。このことは、2B1が、親抗体3G8のFc部分を介するよりも、親抗体3G8由来のCD16-結合部位を介してエフェクター細胞を結合することを示している。2B1はまた、エフェクター細胞の供給源として全ヒト血液を用いるか、または卵巣ガン患者由来のエフェクター

細胞あるいは標的細胞を用いて、標的された細胞溶解を媒介し得る。

本明細書で使用される、用語「1A7」(HB10501)は、本発明の方法において有効な二重特異性抗体を產生し得るハイブリッドハイブリドーマをいう。1A7により產生された二重特異性抗体は、 $\text{FC}_\gamma$  RIIIおよび抗-P-糖タンパク質（多剤耐性抗原またはmdrとも呼ばれる）を認識し、そして結合し得る。1A7ハイブリッドハイブリドーマを、2つの親ハイブリドーマ15D3(HB 11342)および3G8の融合によって形成した。

本明細書中で使用される用語「ウイルス抗原」は、ウイルスのカプシドまたはエンベロープ上に存在する抗原およびウイルスに感染された細胞の表面で発現した抗原をいう。ウイルス抗原は、ヒト免疫ウイルス(HIV)、A型肝炎ウイルス(HAV)、B型肝炎ウイルス(HBV)、C型肝炎ウイルス(HCV)、ヒト乳頭腫ウイルス(HPV)、単純ヘルペスウイルス(HSV)、サイトメガロウイルス(CMV)、エピスタイン・バールウイルス(EBV)、およびインフルエンザウイルスによって產生された抗原を含むが、これらに限定されない。

本発明の方法において有用である特異的なウイルス抗体は、例えば、WO 94/20632(その開示は、本明細書中で参考として援用される)に記載の、糖タンパク質抗原gp 120のV3-PND領域に対する抗HIVモノクローナル抗体である。

本発明の方法において有用な2つの特異的抗HAVモノクローナル抗体は、例えば、Delemaら、Vaccine (1993) 11 (4) : 479-84(その開示は、本明細書中で参考として援用される)に記載されているK3-4C8およびB5-B3(それぞれ、ウイルスの中和されたエピトープを認識する)である。

本発明の方法において有用な特異的抗HBVモノクローナル抗体は、例えば、Budkowskaら、J.of Virology (1995) 69 (2) : 840-8(その開示は、本明細書中で参考として援用される)に記載される、pre-S1領域、pre-S2領域、またはS領域をコードするHBVタンパク質のドメイン中に位置する重要なおよび潜在的な中和エピトープに対する抗体である。

本発明の方法において有用な特異的抗HCVモノクローナル抗体は、例えば、Selbyら、J.of Gen.Virol. (1993) 74: 1103-1113(その開示は、本明細書中で参

考として援用される)に記載のHCV E2抗原(gp68-72)に対するモノクローナル抗体である。

本発明の方法において有用な特異的抗HPVモノクローナル抗体は、例えば、Christensenら、J.of Virol. (1990) 64 (11) : 5678-5681 (その開示は、本明細書中で参考として援用される)に記載のHPV-11抗原に対するH11.A3である。

本発明の方法において有用な特異的抗HSVモノクローナル抗体は、例えば、Bios Pacific、4240 Hollis Street、#290 Emeryville、CA 94608、(510-652-6155)より入手可能である。その明細書(その開示は本明細書中で参考として援用される)において記載されるように、クローンA19080023Aは、HSV-Iのエンベロープ糖タンパクgBに対する抗HSV-I抗体である。

本発明の方法において有用な特異的抗CMVモノクローナル抗体は、例えば、Bios Pacific、4240 Hollis Street、#290 Emeryville、CA 94608、(510-652-6155)より入手可能である。その明細書(その開示は本明細書中で参考として援用される)について記載されるように、クローンA28020069Pは、即時初期非構造的抗原(68~72kD)に対する抗CMV抗体であり、そしてEBV、ADV、VZV、またはHSVと交差反応しない。本発明の方法で有用な別の特異的抗CMVモノクローナル抗体は、例えば、Schleissら、Virology (1994) 202 : 173-185 (その開示は本明細書中で参考として援用される)に記載の主要CMVエンベロープ糖タンパク質である

gB(gp UL 55)に対する抗体である。

本発明の方法において有用な特異的抗EBVウイルスモノクローナル抗体は、Anderssonら、J.Med.Virol. (1994) 43 : 238-244 (その開示は、本明細書中で参考として援用される)に記載の、VCA-IgG(ウイルスカプシド抗原に対する抗体)、およびPinkusら、Modern Pathol. (1994) 7 (4) : 454-61とともに記載(本明細書中で参考として援用される)される潜在膜タンパク質およびエピスタンイン・バールウイルス核抗原-2抗原である。

本発明の方法において有用な特異的抗Fluウイルスモノクローナル抗体は、例えば、Bios Pacific、4240 Hollis Street、#290 Emeryville、CA 94608、(510-652-6155)より入手可能である。その明細書(その開示は、本明細書中で参考

として援用される)において記載されるように、クローンA60010044Pは、ウイルスのサブタイプ、H1N1、H2N2、およびH3N2に対する抗インフルエンザA抗体であり、そしてクローンA60020044Aは、インフルエンザBfluウイルス抗原に対する抗インフルエンザB抗体である。

本明細書中で使用される、用語「真菌抗原」は、主な真菌群に属する任意の腐生下等植物または寄生下等植物由来の抗原をいう。下等植物の門としての真菌は、クロロフィルを欠く腐生下等植物および寄生下等植物を包含し、そして藻菌、子囊菌、担子菌、不完全菌、ならびに変形菌および分裂菌の綱を包含する。これらの綱は、カビ、サビ菌、ウドンコカビ、黒穂病、およびキノコを包含する。真菌抗原は、哺乳動物において病原性であり得るこれらの真菌上で見出される。

本発明の方法として有効な特異的真菌モノクローナル抗体は、例えば、WO 93/08271(その開示は、本明細書中で参考として援用される)に記載の、*C.neoformans*のセロタイプA、B、C、およびD株上の非促進性保護(non-enhancing protective)エピトープに対する抗体である。

本明細書中で使用される、用語「寄生虫抗原」は、通常傷つけられた宿主から利益を得る寄生虫と親密に関連して、別の生物内または生物上で生存する生物由来の抗原をいう。寄生虫より生じる疾患の例は、マラリアである。マラリアは、急性または慢性の疾患で、マラリア原虫属の胞子虫類寄生虫の存在によって発病し、それは感染したハマダラカ属の蚊に刺されることによってヒトからヒトへ感染する。

一旦、宿主に移されると、原生動物は、増員生殖によって無性的に増殖し、そして赤血球細胞の破壊を起こす。

本発明の方法において有用な特異的寄生虫モノクローナル抗体は、例えば、WO 94/03604に記載(その開示は、本明細書中で参考として援用される)のPfEMP3マラリア抗原に対するモノクローナル抗体である。

本明細書中で使用される用語「毒素」は、患者に存在し得るかまたは存在しなくてもよく、そして免疫応答を生じさせ得る他の有毒物質をいう。本明細書中で使用される用語「毒素」は、例えば、生きている生物の代謝活性の特定の産物であり、組織に導入された場合、通常不安定かつ毒性であり、代表的に抗体形成を

誘導する、コロイド状のタンパク質様有毒物質を包含する。本発明の方法に有用な毒素に対する特異的なモノクローナル抗体は、例えば、WO 94/00487（その開示が本明細書中で参考として援用される）に記載の破傷風菌毒素の重鎖フラグメントに対する抗体である。

本明細書中で使用される、句「抗原は、最初の投与の際に患者に存在しない」は、抗原が、本発明の方法において有用な二重特異性抗体の予防投与の際に、存在しないか、または存在することが知られていないことをいう。このような投与は、例えば、ウイルス病原体または細菌病原体による感染の高い危険性を伴う患者、または毒素への曝露の危険のある患者において投与され得る。患者由来の生物学的サンプル中に存在するにも関わらず、抗原を検出し損ねていた患者において、抗原を検出する方法が評価される。従って、患者に存在しない抗原は、患者中に存在しても、抗原が未だ検出されていない状況を包含することが理解されなければならない。

$Fc_{\gamma}$  RIIIおよび腫瘍抗原に対する二重特異性抗体の投与で免疫応答を誘導するプロセスは、腫瘍において、腫瘍細胞と接触し、腫瘍細胞を貧食し、そして溶解するマクロファージを誘導する2B1を含む。腫瘍細胞の貧食および溶解は、溶解された腫瘍細胞により放出されるか、またはその表面上存在するc-erbB2抗原の提示および他の腫瘍特異的抗原の提示の結果得られる。種々の免疫欠損または免疫防御のために腫瘍が以前に拒絶を逃れた場合、2B1を介する抗原提示の様式は、このような防御を回避し得、そして多様な腫瘍エピトープに対する応答性を導く。

本発明は、特定の実施態様を記載する以下の実施例を参考することにより、例示される。しかし、これらの実施態様は、例示であり、いかなる手段においても本発明を制限するために構築されるものでないことに注意されるべきである。

#### 実施例 1

2B1二重特異性抗体臨床試験におけるerbB-2抗体の評価を行った。種々のerbB-2過剰発現一次腫瘍を有する11人の患者を、2B1二重特異性モノクローナル抗体の第I相用量漸増試験（phase I dose escalation trial）で処置した。この用量は

、1、4、5、6、7、および8日目にIVで与えた。応答を、表Iにおいて、進行した疾患（P.D.）、安定した疾患（S.D.）、または潜在的応答（P.R.）として示す。前処置循環血清erbB-2 ECDレベル（血清ECD）をEIAにより測定した。erbB-2抗体に対する前処置抗体応答および後処置抗体応答を、erbB-2抗体ELISAにより検出した。患者の抗マウス抗体応答（抗マウス抗体）を、プレートコート抗原としてマウス抗体を用いて、ELISA技術により検出した。2B1二重特異性抗体のerbB-2結合アームに対する抗イディオタイプ抗体（抗2B1イディオタイプ抗体）を、2B1親抗体を用いたブロッキングELISA（blocking ELISA）により同定し、そしてヒト血清結合をブロックするためにerbB-2タンパク質を精製した。

より詳細には、用量漸増第I相臨床試験において、erbB-2（+）腫瘍を有する患者を、1、4、5、6、7、および8日目に、用量あたり $1\text{ mg}/\text{m}^2$ （n=3）、 $2.5\text{ mg}/\text{m}^2$ （n=6）、または $5.0\text{ mg}/\text{m}^2$ （n=6）で、1時間、2B1静脈内注入で処置した。これらの患者における体液性免疫応答を評価した。顕著なHAMA（ヒト抗マウス抗体）応答が、そして表1の抗マウス抗体処置後の欄に示すように、スタンダードとして靈長類抗マウスIgG反応性を用いて、 $70\text{ ng}/\text{ml}$ から、 $50,000\text{ ng}/\text{ml}$ を超える範囲で、全2B1 IgGおよびその関連抗原結合ドメインに対して検出された。HAM Aは、処置の開始後11日目から222日目まで、一貫して上昇した。 $F_{ab'2}$ 親抗体520C9（抗erbB-2）および3G8（抗CD16）に対する抗イディオタイプ抗体応答のピークは、25と38日との間に示され、その後減少する傾向を示した。

#### 実施例2

2B1二重特異性抗体が、erbB-2に対する免疫応答を導くため使用され得るかどうかを決定するために、実施例1に記載の臨床試験における患者由来の一連の血清サンプルを試験した。用量漸増試験における2B1抗体で処置した初めの11人の患者由来の血清サンプルを、erbB-2タンパク質に対する免疫応答の生成についてを試験した。erbB-2を過剰発現する一次腫瘍の種々の異なる組織学的タイプを有する患者が含まれた。ベースラインおよび11日の血清サンプルは、全ての患者において利用可能であり、そして大多数においていくらか後の時点で回収した。11人の患者のいずれも治療の前に検出可能なerbB-2抗体を有しなかった。これら

の結果を、表1の標識抗H2N抗体の欄に示す。

直接ELISAを、2B1で処置された患者において、erbB-2抗体免疫性をアッセイするのに用いた。精製されたerbB-2タンパク質は、ゲル支持体カラムに共有結合したerbB-2に対して指向されるモノクローナル抗体を用いるイムノアフィニティカラムerbB-2精製スキームにより調製した。SKBR3細胞株の溶解物をerbB-2タンパク質の供給源として使用してカラムに結合し、そして過剰に洗浄してカラムから付着した非特異的タンパク質を除去した後、erbB-2分子を酸溶出を用いて単離した。透析およびタンパク質定量の後、このタンパク質を、Immulon<sup>®</sup>プレートをコートするために用いた。残存する任意のタンパク質結合部位のブロックを、PBS/1%BSAを用いて達成した。次いで2B1患者から回収したヒト血清を、プレートに添加し、1:25から始めて、2倍希釈液で力価測定した。次いで、検出試薬（西洋ワサビペルオキシダーゼに結合されたヒツジ抗ヒト免疫グロブリン）を、この系に添加した。発色は、クロモゲンTMBを用いて開始し、そしてポジティブコントロールウェルが予め決定した光学密度(O.D.)読み取り値に達した時に、酸を用いて停止させた。次いで、全プレートのO.D.を、450ナノメーターで測定した。ネガティブコントロール血清サンプルおよびポジティブコントロール血清サンプルがまた、各々のプレートに含まれた。正常なコントロール集団の平均を超える2つの標準偏差を示したerbB-2特異的抗体を有する患者は、erbB-2タンパク質に対してポジティブな抗体応答を有することが考えられた。

全ての血清erbB-2ECDタンパク質試験を、Triton Diagnosticsにより発色させた酵素免疫アッセイ(EIA)を用いて行ったが、他の類似した試験キットもまた

このアッセイに使用し得る。このアッセイ系は、erbB-2タンパク質の細胞外ドメインに特異的な2つの酵素結合抗体を含む。サンプルのO.D.読み取り値は、公知の量のECDタンパク質の値を用いて作成した標準曲線と比較する。この結果は、EODユニット/m<sup>1</sup>で表わされる。ポジティブな結果についてのカットオフ値は、正常なコントロール集団における平均値からの2つの標準偏差として決定される。

処置後のerbB-2抗体の免疫性の存在は、血清抗体が、治療前ではなく、治療後に、185kDのerbB-2分子を免疫沈降し得ることにより確認された。免

疫沈降に用いたサンプルは、マウス抗erbB-2抗体に起因して、不正確なポジティブな結果またはネガティブな結果を回避するために、患者の循環系から全てのマウス2B1抗体を取り除いた後の十分な時点のものに由來した。

エピトープのマッピングデータについてのウエスタンプロットアッセイを用いた研究により、これらの患者において生成された抗体が、erbB-2分子の細胞内ドメイン（以下「ICD」）および細胞外ドメイン（以下「ECD」）の両方の部位を認識したことが示された。抗イディオタイプ抗体が、レセプターの細胞外領域を認識する2B1二重特異性抗体のerbB-2結合部位を検出したので、ヒト抗体がイディオタイプ／抗イディオタイプ網より生じるECDに対して生じる可能性がある。しかし、ICDに対して生成される抗体により、免疫プロセシングおよび認識のいくつかの他の機構が影響される。同様の説明は、2B1抗体のCD16レセプターアームにより標的された免疫エフェクター細胞が、このプロセスに関与するべきであるということである。誘導されたerbB-2抗体は、30日目およびそれ以降で、イソ型におけるほとんどの部分のIgGに対する抗体である。このことは、一次免疫応答において、IgMから転換する抗体クラスにおけるT細胞の関与を暗示する。

### 実施例 3

本実施例は、2B1のような二重特異性抗体の投与による免疫応答の誘導を示す。2B1の投与は、腫瘍抗原erbB-2の提示を含む免疫応答を生じ得、そして腫瘍細胞に存在する多くの抗原の提示を生じる腫瘍細胞を溶解および貧食するためのマクロファージをまた、活性化し得る。

c-erbB-2以外の多くの腫瘍抗原に対するモノクローナル抗体は、患者が、2B1

での処置前および処置後に、これらの抗原に対する抗体を有するかどうかを検出するための競合免疫アッセイを構築するために使用した。例えば、マイクロタイターウェルを、そのプラスチック表面に種々の腫瘍抗原の吸着を可能にするために、腫瘍細胞株（例えば、MCF-7およびSK-BR-3）の非イオン性界面活性剤抽出物でコートする。使用した細胞株は、入手可能な抗体プローブによって認識される腫瘍抗原を提供するために選択された。過剰な腫瘍細胞抽出物を洗浄して除き、そしてその表面を、その後のタンパク質の非特異的な吸着を最小にするためにウ

シ血清アルブミン、脱脂粉乳タンパク質、またはTween 20のような1つ以上の適切な薬剤を含む溶液でブロックした。ブロック溶液を洗浄して除いた後、二重特異性抗体処置の前または処置後の種々の時点で、患者から得た血漿または血清サンプルの希釈物をウェルに加え、そしてインキュベートして、このウェルに吸着した腫瘍抗原を認識する患者の抗体の特異的な結合を可能にした。次いで、このウェルを、洗浄して非結合抗体(HAMAを含む)を除去した。次いで、目的の腫瘍抗原に特異的なプローブ(例えば、HRPに結合されたモノクローナル抗体)を含有する溶液を、このウェルに添加し、そしてインキュベートして抗原に対するプローブの結合を可能にした。このプローブ溶液は、ウェルに対して非特異的に吸着される任意のHAMAに対するプローブ抗体の結合を妨害するために、マウス血清または1つ以上の無関係のマウス抗体を含み得る。患者の血清または血漿が、プローブにより認識されるガン抗原エピトープに特異的な抗体を含む場合、プローブの結合は、減少され得るかまたは排除され得る。インキュベーション後、過剰なプローブをウェルから洗い出し、そして結合プローブを、発色基質を含む溶液を添加し、発色が可能になるまでインキュベートし、そしてELISAプレートリーダーでプレートを読み取ることにより、定量する。

あるいは、マイクロタイターウェルを、患者を処置するために使用する二重特異性抗体により認識される特定の腫瘍抗原を含まない腫瘍細胞抽出物でコートし得る。次いで、ウェルをブロックし、そして上記のように、患者の血清または血漿の希釈液に曝露した。次いで、ウェルを特定のガン抗原に特異的なプローブを用いるよりも、ウェルはヒト免疫グロブリンに特異的な抗体-HRPプローブを用いてインキュベートし、そしてプローブの結合を上記のように測定する。二重特

異性抗体処置後に、処置前よりも多くのヒト免疫グロブリンがウェルに結合する場合、腫瘍抗原に対する抗体の発生を引き起こしたと結論づける。腫瘍細胞抽出物を、二重特異性抗体により認識される特定の腫瘍細胞を含まないように選択したので、異なる腫瘍抗原が認識されることがさらに結論づけられた。

#### 実施例4

T細胞応答の二重特異性抗体の誘導を研究するために、いくつかのT細胞アッ

セイを構築し得る。ヘルパーT細胞応答の後、SniderおよびSegal、(1987) J. Immunol. 139: 1609-16に記載されるように、目的の抗原を与える抗原提示細胞への曝露後、T細胞増殖16~20またはIL-2を測定し得る。細胞傷害性T細胞の応答は、Disisら、(1994) Cancer Research 54: 1071-1076に記載の、関連腫瘍抗原で感作される放射標識抗原提示細胞を溶解することにより検出される。この実施例4における参考文献の開示は、本明細書中で参考として援用される。

#### 寄託情報

本明細書中で開示される抗体産生ハイブリドーマのATCC寄託番号は、42H8 (HB 11830)、35E6 (HB11769)、および36H3 (HB11768)である。アメリカンタイプカルチャーコレクションは、12301 Parklawn Drive, Rockville, MD, USA (ATCC)に所在する。

これらの寄託は、特許手続の目的のための微生物の寄託の国際承認に基づくブダペスト条約およびその下での規程（ブダペスト条約）からの分譲下でなされる。この寄託は、寄託の日より30年間、生存培養物の維持を請け負う。この生物は、ブダペスト条約の名の下で、ATCCにより利用可能にされ、そしてカイロンコーポレーションとATCCとの間で契約されており、適切な米国特許の発行の際または任意の米国出願または外国出願が公になる際に、どちらが先であっても、一般人への継代培養の永久的なおよび無制限の利用を保障し、そして米国特許法第122条および長官により定められた特別な事情（886 O.G. 638を参考とする米国特許施行規則第1.12条を含む）に従って、権利を与えられた米国特許商標局長官によって決定された人に、継代物の利用を保障する。

本明細書中で引用された特許、特許出願、および刊行物は、本明細書中で参考として援用される。

本発明は、特定の実施態様を参考して記載される。しかし、この出願は、添付の請求項の精神および範囲から逸脱することなく、これらの改変および置換が当業者によりなされ得ることが意図される。

## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Int'l Application No PCT/US 95/15476
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 6 A61K39/395 A61K39/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Maximum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 A61K		
Documentation searched other than maximum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CANCER RESEARCH, vol. 53, 1993 pages 94-100, WEINER, L.M. ET AL. cited in the application see abstract	1-8
Y	---	9-44
X	CANCER RESEARCH, vol. 52, 1992 pages 6832-6839, HSIEH-MA, S.T. ET AL. cited in the application see abstract	1-8
Y	---	9-44
	-/-	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
* Special categories of cited documents:		
'A' document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance		
'B' earlier document but published on or after the international filing date		
'C' document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)		
'D' document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		
'E' document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
'F' later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention		
'G' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone		
'H' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art		
'I' document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search  1 April 1996		Date of mailing of the international search report  16.04.96
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. Box 3018 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Telex 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Olson, L

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/US 95/15476

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Classification of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CANCER RESEARCH, vol. 52, 1992 pages 5713-5719, GARCIA DE PALAZZO, I. ET AL. cited in the application see abstract ---	1-5
Y		6-44
X	BREAST EPITHELIAL ANTIGENS, ED. R.L. CERJANI, (PLENUM PRESS, NY, 1991), pages 91-104, RING, D.B. ET AL. cited in the application see the whole document ---	1-8
Y		9-44
X	GANN MONOGRAPH ON CANCER RESEARCH, NO. 40, ED. T. OGURA AND F. TAKAKU, (JAPAN SCIENTIFIC SOCIETIES PRESS, TOKYO/CRC PRESS, BOCA RATON ANN ARBOR LONDON TOKYO, 1993), pages 95-106, YAGITA, H. ET AL. see the whole document ---	1-5
Y		6-44
X	INT. J. CANCER, vol. 55, 1993 pages 830-836, HOMBACH, A. ET AL. see the whole document ---	1-5
Y		6-44
X	WO,A,92 08802 (CETUS CORPORATION) 29 May 1992 see page 1; claims 1-25 ---	1-8
Y		9-44
X	DE,C,43 37 197 (BIOTEST PHARMA GMBH) 25 August 1994 see the whole document -----	1-5
Y		6-44

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International Application No  
**PCT/US 95/15476**

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO-A-9208802	29-05-92	AU-B-	8727291	11-06-92
		EP-A-	0557308	01-09-93
DE-C-4337197	25-08-94	EP-A-	0657533	14-06-95
		JP-A-	7246091	26-09-95

---

フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	F I	
C 12 N 15/09		C 12 N 15/00	C
C 12 P 21/08			A
(81)指定国	EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M C, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG , CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(KE, LS, MW, SD, SZ, U G), AM, AT, AU, BB, BG, BR, BY, C A, CH, CN, CZ, DE, DK, EE, ES, FI , GB, GE, HU, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LT, LU, LV, MD, M G, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO , RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TT, UA, UG, UZ, VN		

【公報種別】特許法第17条第1項及び特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第3部門第2区分

【発行日】平成15年5月13日(2003.5.13)

【公表番号】特表平10-511085

【公表日】平成10年10月27日(1998.10.27)

【年通号数】

【出願番号】特願平8-519017

【国際特許分類第7版】

A61K 39/395 ABD

C12N 15/02

15/09

C12P 21/08

【F I】

A61K 39/395 ABD Q

R

S

T

C12P 21/08

C12N 15/00

C

A

手続権記書

平成14年11月26日

特許庁長官 繳

1. 事件の表示

平成9年特許願第519017号

2. 補正をする者

住所 アメリカ合衆国 カリフォルニア 94608, エミリービル,  
ホートン ストリート 4560

名称 カイロン コーポレイション

3. 代理人

住所 〒540-6015 大阪府大阪市中央区城見一丁目2番27号

クリスタルタワー15階

氏名 (7828)弁理士 山本 秀哉

電話(大阪) 06-6949-3910

4. 補正対象書類名

請求の範囲

5. 補正対象項目名

請求の範囲

6. 補正の内容

請求の範囲を別紙のとおり補正します。

請求の範囲

1. 患者の免疫応答を誘導するための薬学的組成物であって、該薬学的組成物は、  
二重特異性抗体を含み、該二重特異性抗体が、Fc<sub>Y</sub>RIIIである第1の抗原を認識  
および結合し得る第1の結合部位を含み、そしてさらに、第2の抗原を認識お  
よび結合し得る第2の結合部位を含む抗体である、薬学的組成物。

2. 前記第1の結合部位が、3G8ハイブリドーマより產生されるモノクローナル  
抗体由来の結合部位である、請求項1に記載の組成物。

3. 前記第2の抗原が患者体内に存在する、請求項1に記載の組成物。

4. 前記第2の抗原が自己抗原である、請求項1に記載の組成物。

5. 前記第2の抗原がガン抗原である、請求項1に記載の組成物。

6. 前記ガン抗原が、145kD腫瘍タンパク質、42kD腫瘍タンパク質、および癌  
細胞膜表面抗原からなる群より選択される、請求項5に記載の組成物。

7. 前記ガン抗原が、以下からなる群より選択される、請求項5に記載の組成  
物:

c-erbB-2, 145kD, 175kD, 40kD, 60kD, 100kD, 42kD, 65kD, 86kD, 75kD, 8  
0kD, 離瘍膜表面抗原、Tamm-Ch, IDムチンII, およびp-糖タンパク質。

8. 前記第2の結合部位が、以下からなる群より選択されるハイブリドーマによ  
り产生されるモノクローナル抗体由来の結合部位を含む、請求項7に記載の組成  
物:

42E8(HB11830), 462F1(HB10811), 741F8(HB10807), 520C9(HB8696), 759E3  
(HB10808), 454C11(HB8484), 387D9(HB10802), J13F1(HB8490), 317G5(HB8485),

特表平10-511085

(HB8691)、34F2(HB11052)、650E2(HB10812)、35E6(HB111769)、266B2(HB5426)、106A10(HB10719)、260F9(HB8488およびHB8662)、33F8(HB8691)、9C6(HB10785)、35E10(HB10786)、140A7(HB10798)、36H3(HB11768)、768G6(HB8692)、200F5(HB10791)、69T83(HB10809)、120H7(HB10790)、203E2(HB10799)、254H9(HB10793)、24SE7(HB8449)、263(HB8491)、369F10(HB8682)、160J3(HB11342)、421E8(HB10795)、310B7(HB11752)、32A1(HB10796)、219P3(10801)、42E7(HB11751)、および368D4(HB10794)。

9. 前記二重特異性抗体が、CE10197およびHB10E01からなる群より選択されるハイブリドーマにより発生される、請求項1に記載の組成物。

10. 前記ガム抗原が、以下からなる群より選択される、請求項5に記載の組成物:

- a) 細胞上皮癌細胞抗原;
- b) 300,000ダルトンの糖タンパク質乳ガム抗原; および
- c) ガムに関連する、195KD腫瘍関連抗原;
- d) 肿瘍関連ガングリオシド。

11. 前記腫瘍関連ガングリオシドが、CD3、GD3、GM3、GM1、C2、6C、Le<sup>a</sup>、またはLe<sup>b</sup>である、請求項10に記載の選択的組成物。

12. 前記第2の抗原が、ウイルス抗原である、請求項1に記載の組成物。

13. 前記ウイルス抗原がウイルスにより発現され、該ウイルスが、HIV、HAV、HBV、BCV、HPV、HSV、CMV、EBV、およびインフルエンザウイルスからなる群より選択される、請求項12に記載の組成物。

14. 前記ウイルス抗原が、HIV抗原である、請求項13に記載の組成物。

15. 前記HIV抗原が、HIV糖タンパク質である、請求項14に記載の組成物。

16. 前記HIV抗原が、HIV糖タンパク質gp120である、請求項15に記載の組成物。

17. 前記HIV抗原が、HIV糖タンパク質gp120のV3-ND領域である、請求項16に記載の組成物。

18. 前記ウイルス抗原が、HIV抗原である、請求項12に記載の組成物。

19. 前記HIV抗原が、抗HIVモノクローナル抗体E3-4CBおよびE5-53に結合する、請求項18に記載の組成物。

20. 前記ウイルス抗原が、HBV抗原である、請求項12に記載の組成物。

21. 前記HBV抗原が、HBV糖タンパク質のpre-S1領域、pre-S2領域、またはS領域をコードするドメインである、請求項20に記載の組成物。

22. 前記ウイルス抗原が、HCV抗原である、請求項12に記載の組成物。

23. 前記HCV抗原が、E1またはE2のいずれかである、請求項22に記載の組成物。

24. 前記ウイルス抗原が、HPV抗原である、請求項12に記載の組成物。

25. 前記HPV抗原が、HPV11型抗原である、請求項24に記載の組成物。

26. 前記ウイルス抗原が、HSY抗原である、請求項12に記載の組成物。

27. 前記HSV抗原が、HSVエンベロープ糖タンパク質である、請求項26に記載の組成物。

28. 前記HSVエンベロープ糖タンパク質が、クローンAI19080023A、AI19090023A、AI19100023A、AI19110023A、またはAI19180023Aとして同定された抗体に結合する、請求項27に記載の組成物。

29. 前記ウイルス抗原が、CMV抗原である、請求項12に記載の組成物。

30. 前記CMV抗原が、CMVまたは主要CMVエンベロープ糖タンパク質であるgB (gB1L65)に対する、即時初期非構造的抗原、および即時初期抗原、初期抗原、後期抗原である、請求項29に記載の組成物。

31. 前記CMV抗原が、CMV抗原クローンA28020069PまたはA28030069Pに対するモノクローナル抗体に結合する、請求項30に記載の組成物。

32. 前記ウイルス抗原が、EBV抗原である、請求項12に記載の組成物。

33. 前記EBV抗原が、潜在膜タンパク質 (LMP) またはエブスタイン・バールウイルス核抗原-2のいずれかである、請求項32に記載の組成物。

34. 前記ウイルス抗原が、インフルエンザウイルス抗原である、請求項33に記載の組成物。

35. 前記インフルエンザウイルス抗原が、インフルエンザウイルスAまたはインフルエンザウイルスBに対する抗原である、請求項34に記載の組成物。

36. 前記インフルエンザウイルスが、インフルエンザA感染ウイルスクローンA60010044Pに対するモノクローナル抗体に結合する、または前記インフルエンザ

ウイルスBが、インフルエンザB感染ウイルスクローンA60020044Aに対するモノクローナル抗体に結合する、請求項35に記載の組成物。

37. 前記第2の抗原が、真菌抗原である、請求項1に記載の組成物。

38. 前記真菌抗原が、C. neoformansのポリ多糖である、請求項37に記載の組成物。

39. 前記第2の抗原が、寄生虫の抗原である、請求項1に記載の組成物。

40. 前記寄生虫の抗原が、マラリア抗原である、請求項39に記載の組成物。

41. 前記マラリア抗原が、ペプチドPfEMP3である、請求項40に記載の組成物。

42. 前記第2の抗原が、毒素である、請求項1に記載の組成物。

43. 前記毒素が、破壊性毒素である、請求項42に記載の組成物。

44. 前記抗原が、破壊性毒素の東C類フラグメントである、請求項43に記載の組成物。

45. 前記第2の抗原が、二重特異性抗体を一次投与した患者には存在しない、請求項1に記載の組成物。

46. 患者の免疫応答を誘導するための二重特異性抗体であって、既二重特異性抗体が、Fc<sub>γ</sub>R II/IIIである第1の抗原を認識および結合し得る第1の結合部位を含み、そしてさらに、第2の抗原を認識および結合し得る第2の結合部位を含む抗体である、二重特異性抗体。